

IMMUNISATION PASSIVE DES POUSSINS PAR L'ADMINISTRATION D'UN AUTOVACCIN AUX POULES REPRODUCTRICES

Keita Alassane¹, Le Devendec Laetitia¹, Amelot Michel¹, Puterflam Julie², Lucas Camille¹, Bougeard Stéphanie¹, Delannoy Sabine³, Schouler Catherine⁴, Fach Patrick³, Souillard Rozenn¹, Kempf Isabelle¹

¹ANSES - BP53 - 22440 PLOUFRAGAN

²ITAVI - 41 rue de Beaucemaine - 22440 PLOUFRAGAN

³ANSES - 14 rue Pierre et Marie Curie - 94700 MAISONS-ALFORT

⁴ISP, INRAE - Université de Tours - 37380 NOUZILLY

Alassane.keita@anses.fr

RÉSUMÉ

La colibacillose, due à certaines souches de *Escherichia coli* (APEC) est une cause majeure de mortalité et d'utilisation d'antibiotiques chez les volailles. Aucun moyen efficace n'existe aujourd'hui pour prévenir cette pathologie chez le poussin. Nous avons évalué l'efficacité d'un autovaccin chez le poussin par administration chez les reproducteurs. Trois souches APEC caractérisées (facteurs de virulence, séro groupe et phylogroupe) ont été utilisées pour mettre au point des modèles de reproduction de la colibacillose chez le jeune poussin (phase 1). Les animaux ont été inoculés en sous cutané à 1 ou 2 jours d'âge avec environ 3×10^7 E. coli par animal et la mortalité a été suivie pendant 10 jours. Deux des souches ont ensuite servi à fabriquer un autovaccin bivalent qui a été administré à des poules reproductrices. Les poussins issus de poules vaccinées ou non ont été inoculés avec chacune des souches APEC du vaccin (challenges homologues) lors de la phase 2.

Deux des souches (AP1 et AP2) se sont révélées virulentes pour le poussin, la troisième (AP3) n'a entraîné ni mortalité ni signe clinique. AP1 induit une maladie sévère avec la mort de tous les poussins en moins de 6 jours et AP2 une mortalité d'environ 50%. Dans nos conditions, aucune protection passive n'a été observée vis-à-vis de AP1, avec au moins 90% de mortalité chez les poussins issus de poules vaccinées ou non. A contrario, ceux issus de poules vaccinées, et inoculés avec AP2 présentaient un taux de mortalité (40%) significativement moins élevé que ceux issus de poules non vaccinées (80%). Cette protection, observée lors de challenges homologues doit être confirmée en tenant compte d'autres paramètres (challenges hétérologues notamment).

ABSTRACT

Passive immunisation of chicks using an autogenous vaccine when administered in breeders

Avian Colibacillosis, caused by pathogenic strains of *Escherichia coli* (APEC) is a major cause of death and antibiotic use in poultry. There is no effective means today to prevent this pathology in chicks. We evaluated the efficacy of an autogenous vaccine in chicks by administration in breeders. Three characterized APEC strains (virulence factors, serogroup and phylogroup) were used to develop in vivo models of colibacillosis in young chicks (phase 1). Animals were inoculated subcutaneously at 1-2 days of age with approximately 3×10^7 E. coli per animal and mortality was monitored for 10 days. Two APEC strains were then used to produce a bivalent autogenous vaccine which was administered to breeder hens. Chicks from vaccinated and unvaccinated hens were inoculated with each of the APEC strains of the vaccine (homologous challenges) during the phase 2.

Two of the strains (AP1 and AP2) were found to be virulent for chicks, the third (AP3) did not cause any mortality nor clinical signs. AP1 causes severe disease with the death of all chicks within 6 days and AP2 causes approximately 50% mortality. Under our conditions, no passive protection was observed against AP1, with at least 90% mortality in chicks from vaccinated or unvaccinated hens. Conversely, those from vaccinated hens and challenged with AP2 had significantly lower mortality rate (40%) than those from unvaccinated hens (80%). This protection, observed during homologous challenges, has to be confirmed taking into account other parameters (heterologous challenges in particular).

INTRODUCTION

La colibacillose aviaire est la pathologie bactérienne dominante dans les élevages de *Gallus gallus* (poulets de chair et poules pondeuses notamment). Elle est due aux souches pathogènes d'*Escherichia coli* (appelées APEC pour Avian Pathogenic *Escherichia Coli*) qui provoquent des infections extra-intestinales chez les volailles. Elle entraîne une mortalité et une morbidité élevées et des baisses de production. De plus, *E. coli* peut être un pathogène zoonotique d'origine alimentaire et une source ou un réservoir d'infections extra-intestinales chez l'homme (Maryvonne Moulin-Schouleur et al., 2007 ; Liu et al., 2018). Pour contrôler la maladie, des antibiotiques sont fréquemment utilisés. Ces traitements constituent un risque avéré de sélection et de dissémination de gènes de résistance et de souches bactériennes résistantes, posant également un problème de santé publique. La colibacillose s'exprime le plus souvent chez le poussin de moins d'une semaine mais également après 15 jours d'âge. Une des problématiques est donc de pouvoir protéger le poussin dès l'éclosion.

Les APEC possèdent de nombreux facteurs de virulence et une combinaison de ces facteurs pour provoquer la colibacillose (Christensen et al., 2021 ; Kathayat et al., 2021). Différents profils génétiques peuvent être ainsi définis sans qu'il y ait un moyen simple de déterminer leur pathogénicité éventuelle chez le poulet.

Du fait de cette diversité génétique, notamment, et de la nécessité de protéger le poussin dès l'éclosion, il n'existe aujourd'hui aucun vaccin commercial répondant à la demande des éleveurs. Le seul vaccin commercial disponible contient une souche d'*E. coli* O78 atténuée, offrant une protection vis-à-vis de cette souche, avec un début d'immunité s'établissant 2 semaines après la vaccination. Il permet de réduire les lésions dues à la colibacillose mais pas la mortalité, alors même que ce paramètre est essentiel dans le contrôle de la maladie (Galal et al., 2018). Pour ces raisons, ce vaccin souffre d'une efficacité limitée et est donc peu utilisé.

Les autovaccins pourraient apporter une réponse satisfaisante à cette diversité de souches. Ils sont produits à partir de souches APEC isolées dans le troupeau atteint où l'autovaccin est utilisé. Un tel vaccin pourrait être utilisé soit directement sur les animaux cibles, soit via une stratégie d'immunisation passive (administration du vaccin aux mères et transmission des anticorps aux poussins). Cette dernière stratégie aurait pour objectif de protéger le poussin dès l'éclosion. De plus, il n'est pas économiquement viable d'utiliser un vaccin inactivé chez le poussin car cela demanderait une manutention dont le coût ne pourrait être supporté par les filières avicoles. En revanche, une poule donnant plusieurs dizaines voire centaines d'œufs, le fait d'administrer l'autovaccin à la poule pour protéger le poussin reste

une stratégie pérenne, y compris lorsque cela nécessite plusieurs injections vaccinales.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Sélection et caractérisation des souches APEC

La sélection a été faite à partir de 1050 *E. coli* isolés de cas cliniques ou d'environnement, sur lesquels 68 variables ont été mesurées (66 marqueurs de virulence ainsi que le phylogroupe et le séroroupe). Notre premier objectif était de sélectionner trois souches APEC représentatives ayant provoqué de la colibacillose en élevage, dans le but de les utiliser pour la mise au point de modèles. De ce fait, les analyses statistiques (incluant l'analyse par correspondance multiple et ensuite le « clustering » hiérarchique optimisé) ont été effectuées sur un échantillon de 268 APEC répondant à ce critère. Les 3 souches sont nommées *E. coli* 19-381 (AP1), 19-383 (AP2-M1) et 19-385 (AP3-M1).

Les groupes phylogénétiques de AP1, AP2-M1 et AP3-M1 sont respectivement B2, F et B1.

1.2. Phase 1 : pathogénicité des souches AP1, AP2-M1 et AP3-M1 pour les poussins

Deux souches de poulet ont été utilisées. La première est la race Leghorn de l'Anses et la seconde est le Ross 308 de la société Aviagen, qui est la souche de poulet de chair la plus répandue en Europe.

L'utilisation de deux souches de poulet a permis de vérifier la sensibilité de notre souche Leghorn EOPS vis-à-vis des APEC par rapport à celle du Ross 308. Les souches d'*E. coli* ont été inoculées aux poussins âgés d'1 à 2 jours, par voie sous cutanée (environ 3.10^8 *E. coli* par ml à raison de 0,1 ml par animal), les animaux témoins recevant le milieu de culture stérile (EPT), selon le tableau 1 ci-dessous.

Les animaux ont ensuite été suivis jusqu'à J9 (J0 = inoculation). En cas de mortalité ou après sacrifice à J9, les animaux ont été autopsiés et les lésions spécifiques de la colibacillose recherchées : aérosacculite, péricardite, péri-hépatite. Des essais de réisolement des *E. coli* inoculées ont été effectués, à partir des foies et rates des oiseaux autopsiés. Les critères suivants ont été analysés : mortalité, gains de poids entre J0 et J9, réisolement à partir du foie et de la rate.

1.3. Phase 2 : immunisation passive

Un autovaccin bivalent (souches AP1 et AP2-M1) inactivé et adjuvé a été fabriqué par un laboratoire agréé (Laboce, Ploufragan).

Quarante poules Leghorn EOPS, hébergées dans des cages aménagées, ont été réparties aléatoirement en

deux lots: 20 d'entre elles ont été vaccinées deux fois à 20 et 22 semaines et les 20 autres ont reçu une solution saline aux mêmes âges (groupe témoin). Chaque cage abritait également 4 coqs Leghorn EOPS non vaccinés. Des œufs fertiles ont été collectés pendant deux semaines après la deuxième vaccination. Par conséquent, ces œufs ont été collectés sur des poules âgées de 22 à 24 semaines. Les poules ont été observées pour une évaluation clinique de la première injection jusqu'à la fin de la collecte des œufs. Les œufs fertiles des deux groupes de poules ont été incubés dans le même incubateur mais en évitant de les mélanger. Des poussins d'un jour ont ensuite été obtenus à partir de poules vaccinées et non vaccinées. Six groupes de 20 poussins ont ensuite été constitués aléatoirement de manière à obtenir des poids moyens (et écart-type) similaires dans les différents groupes (Tableau 2). Tous les oiseaux ont été bagués. Les animaux d'un groupe donné ont été hébergés dans des isolateurs à pression négative de niveau 2. Les mêmes paramètres que pour l'expérience de pathogénicité ont été suivis : mortalité quotidienne, poids corporel avant inoculation et à la fin de l'expérience. En cas de mortalité ou pour dix oiseaux vivants à la fin de l'expérience, des lésions de colibacillose ont été déterminées et des échantillons de foie et de rate ont été prélevés.

1.4. Analyse des données

Les taux de mortalité ont été analysés par le test du Chi-deux ou le test exact de Fischer pour les petits échantillons. Les poids ont été comparés entre groupes par ANOVA ou le test de Wilcoxon, en fonction du nombre d'observations et de la vérification des hypothèses de normalité. Le seuil de signification était de $p < 0,05$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Essai de pathogénicité

Le profil de virulence des trois souches APEC était très différent.

La mortalité chez les poussins Ross308 était de 0% (groupes témoin et AP3-M1), 84% (groupe AP2-M1) et 100% (groupe AP1), tous les animaux mourant dès le lendemain de l'inoculation pour cette dernière APEC. Concernant les poussins Leghorn, la mortalité a été de 0% (groupes témoin et AP3-M1), 52% (AP2-M1) et 100% (AP1), tous les animaux mourant avant J4 pour cette dernière APEC. Ainsi, on peut observer que les deux races de poulets étaient sensibles à la colibacillose, même si le taux de mortalité était significativement plus élevé pour les Ross308 que pour les Leghorn pour l'APEC AP2-M1. Conformément aux résultats de mortalité, le poids vif à J9 des poussins témoins et des poussins inoculés avec AP3-M1, quelle que soit la souche de poulet,

était significativement plus élevé que ceux des poussins survivants inoculés avec AP2-M1.

Concernant les résultats post-mortem, aucune lésion n'a été observée dans le groupe témoin. Dans les autres lots, une congestion généralisée a été notée lorsque la mort était subite. A l'inverse, lorsque les animaux ont survécu quelques jours, des lésions de péricardite et de périhépatite ont été observées.

Les nombres d'oiseaux positifs (réisollements de la souche *E. coli* inoculée) dans les groupes inoculés étaient significativement différents, avec le ratio le plus élevé dans le groupe inoculé avec AP1 (32 oiseaux positifs sur 32 analysés) et le plus faible dans le groupe inoculé avec AP3-M1 (7 oiseaux positifs sur 20 analysés), le groupe inoculé avec AP2-M1 étant intermédiaire (43 oiseaux positifs sur 50 analysés). Tous les isolats appartenaient aux phylogroupes attendus.

2.2. Immunisation passive

Aucun signe clinique n'a été observé chez les poules vaccinées ni chez les poules témoins. De plus, la production d'œufs et la fertilité des deux groupes étaient similaires.

Aucune mortalité de poussins n'a été notée dans les groupes témoins (témoin négatif et témoin vacciné). Aucune différence significative de mortalité n'a été notée entre les animaux non vaccinés et vaccinés (90 % contre 95 %) qui ont été inoculés avec la souche AP1. A l'inverse, pour les animaux qui ont été inoculés avec la souche AP2-M1, le taux de mortalité était significativement plus faible dans le groupe vacciné (40 %) que dans le groupe non vacciné (80 %), comme le montre également la figure 1.

CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons sélectionné trois souches d'*E. coli* représentatives parmi plusieurs centaines d'APEC isolées de cas de colibacillose, pour des essais expérimentaux. Deux souches APEC se sont révélées très virulentes pour les poussins d'un jour, tandis que la troisième n'a induit aucune mortalité. Un autovaccin bivalent a ensuite été produit pour l'essai d'immunisation passive. Nous avons clairement démontré la protection des poussins vis-à-vis de l'une des deux souches APEC. Les travaux devraient se poursuivre pour évaluer l'effet de la quantité d'APEC inoculée, de l'âge des poules, du nombre de souches APEC dans l'autovaccin ou de différents adjuvants et étudier la persistance et les mécanismes de protection de l'immunisation passive et la protection contre les souches APEC hétérologues. L'âge des poules (45 semaines en phase 1 versus 24) pourrait expliquer la mortalité différente (50% en phase 1 versus 80%) due à AP2 entre les deux phases.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Christensen, H., Bachmeier, J. & Bisgaard, M. (2021). New strategies to prevent and control avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Avian Pathology*, 1-12.
- Galal, H.M., Tawfek, A.M., Abdrabou, M.I., Hessain, A.M., Alhaaji, J.H., Kabli, S.A., et al. (2018). Recent approaches for control of *E. coli* and respiratory complex in Middle East. *Saudi journal of biological sciences*, 25, 1302-1307.
- Kathayat, D., Lokesh, D., Ranjit, S. & Rajashekara, G. (2021). Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC): An Overview of Virulence and Pathogenesis Factors, Zoonotic Potential, and Control Strategies. *Pathogens*, 10.
- Maryvonne Moulin-Schouleur, M.R., Sylvie Laurent, Annie Brée, Sandrine Mignon-Grasteau, Pierre Germon, Denis Rasschaert, and Catherine Schouler. (2007). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains of Avian and Human Origin: Link between Phylogenetic Relationships and Common Virulence Patterns. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 3366–3376.

Tableau 1. Dispositif expérimental pour l'essai de pathogénicité des souches APEC testées

Animalerie	Parquet A	Parquet B
1	25 poussins EOPS inoculés EPT	25 poussins Ross inoculés EPT
2	25 poussins EOPS inoculés 19-381	25 poussins Ross inoculés 19-381
3	25 poussins EOPS inoculés 19-383-M1	25 poussins Ross inoculés 19-383-M1
4	25 poussins EOPS inoculés 19-385-M1	25 poussins Ross inoculés 19-385-M1

Tableau 2. Dispositif expérimental pour l'essai d'immunisation passive

Groupe(nombre)	Type	Poussins issus de poules vaccinées	Souche <i>E. coli</i> de challenge
NVNC (20)	Témoin négatif	Non	Non
NVC381 (20)	Non vacciné et challengé –AP1	Non	AP1
NVC383M (20)	Non vacciné et challengé –AP2-M1	Non	AP2-M1
VNC (20)	Témoin vacciné	Oui	Non
VC381 (20)	Vacciné et challengé AP1	Oui	AP1
VC383M (20)	Vacciné et challengé –AP2-M1	Oui	AP2-M1

Figure 1. Evolution du taux de mortalité post challenge avec AP2-M1 chez les poussins non vaccinés (NVC) et vaccinés (VC)

